



The 70-kilodalton Adenylyl Cyclase-Associated Protein Is not Essential for Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* Adenylyl Cyclase with RAS Proteins

汪, 俊

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1236

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001236>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	注	俊	（中国）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）		
学位記番号	博い第866号		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位授与の日付	平成6年3月31日		
学位論文題目	1) The 70-kilodalton Adenylyl Cyclase-Associated Protein Is Not Essential for Interaction of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Adenylyl Cyclase with RAS Proteins（分子量7万のアデニル酸シクラーゼ結合蛋白質CAPは出芽酵母アデニル酸シクラーゼのRAS蛋白質との相互作用に必須ではない） 2) Analysis of the Function of the 70 - kilodalton Cyclase - Associated Protein(CAP) by Using Mutants of Yeast Adenylyl Cyclase Defective in CAP binding（分子量7万のシクラーゼ結合蛋白質CAPを結合しない出芽酵母アデニル酸シクラーゼ変異体を用いたCAPの機能解析）		
審査委員	主査 教授	片岡 徹	
	教授	本間 守男	教授 前田 盛

論文内容の要旨

I はじめに

ras プロト癌遺伝子は、真核生物に広く存在し、細胞の増殖および分化の調節に重要な働きをしていることが知られている。*ras* プロト癌遺伝子産物（RAS蛋白質）は低分子量GTP結合蛋白質ファミリーの一員であり、脊椎動物では細胞増殖因子受容体からのシグナルを核に伝達する中間段階を担っていると考えられている。しかし、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）においては、そのRAS蛋白質がアデニル酸シクラーゼ（*CYR1* 遺伝子産物）をGTP依存性に調節（活性化）している事が知られている。アデニル酸シクラーゼにより産生された環状AMP（cAMP）は、出芽酵母の細胞増殖に必須である。また、酵母とヒトのRAS蛋白質は機能的な互換性があり、ヒトのRAS蛋白質も出芽酵母シクラーゼを活性化できる。アデニル酸シクラーゼは2026アミノ酸よりなる活性サブユニットと分子量約7万のシクラーゼ結合蛋白質（Cyclase-Associated Protein）CAPの複合体より成る。CAPの機能に関して、CAPは二つの機能をもつ蛋白質であり、カルボキシ末端側は多分アクチンと結合して細胞骨格の維持に関係しており、アミノ末端側は、シクラーゼのRAS蛋白質との相互作用に必要であることが提唱されていた。本研究において、我々はアデニル酸シクラーゼに人為的突然変異を導入し、RAS蛋白質およびCAPとの相互作用に必要な部位を同定した。また、CAPの機能を解析した結果、CAPを結合しないシクラーゼ変異体を作製し、それを用いてCAPのRAS-cAMP系における機能について解析した。

II 実験方法と結果

1. 出芽酵母アデニル酸シクラーゼのRAS蛋白質との相互作用部位の解析

シクラーゼ分子上アミノ酸番号700-1300には、活性部位と独立しそのアミノ末端側に存在するロイシンに富む23アミノ酸の単位配列の26回の反復構造を持つ600アミノ酸の領域（leucine-rich repeat）が存在する。以前の欠損および挿入変異導入実験から、この領域がRAS蛋白質との相互作用に重要である事が示唆されていた。今回、各反復単位のコンセンサス配列 PXX α XXLXX

LXXLXLXXNX α XX α (P:プロリン、L:ロイシン、N:アスパラギン、 α :脂肪族アミノ酸、X:アミノ酸不特定)の一つに合成オリゴヌクレオチドを用いてアミノ酸置換変異を導入し、変異体シクラーゼのRAS蛋白質による試験管内での活性化を測定する事により、RAS蛋白質との相互作用に必要なアミノ酸残基を調べた。この結果、上記単位配列の1番目のプロリン、10番目、13番目のロイシン、20番目の脂肪族アミノ酸を他の種類のアミノ酸に置換すると、シクラーゼのRAS蛋白質との反応性が完全に喪失するが、7番目のロイシン、18番目のアスパラギンは他の種類のアミノ酸に置換しても影響がない事が判明した。また、26回の反復中1単位を欠失させても、RAS蛋白質との反応性が喪失した。

2. RAS反応性シクラーゼ複合体の構造解析

酵母細胞内で過剰発現させたシクラーゼを含む高分子量複合体をゲルろ過高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分画し見かけの分子量を求めた。Mgイオン存在下RAS蛋白質依存性活性をもつ複合体は、分子量約89万であったが、Mnイオン存在下RAS非依存性活性を有する複合体の分子量は約67万であった。抗CAP抗体を用いたWestern blot法により、CAPがRAS反応性複合体のみに存在している事を証明した。一方、leucine-rich repeat内にアミノ酸変異を持ち、RAS蛋白質との反応性を喪失したシクラーゼは、約200万の高分子量の異常に凝集した複合体を形成している事が判明した。

3. CAPのRAS-シクラーゼ相互作用における意義

部位特異的遺伝子破壊法により染色体上CAP遺伝子をこわして作成したCAP欠損細胞内で発現したシクラーゼの試験管内でのRAS蛋白質による活性化を調べた。その結果、CAPはシクラーゼのRAS蛋白質による活性化には必要ではない事がわかった。CAP欠損細胞ではRAS蛋白質依存性活性をもつシクラーゼ複合体の分子量は約67万に低下していた。

4. アデニル酸シクラーゼのカルボキシ末端部の過剰発現による活性型RAS^{Val19}の熱ショック感受性形質の抑制

シクラーゼのカルボキシ末端領域を活性型RAS²遺伝子(RAS^{Val19})を有する酵母細胞内で過剰発現すると、活性型RASの表現型(熱ショック感受性)が強く抑制された。この抑制に必要な最小領域は、シクラーゼへの欠失変異導入実験によりカルボキシ末端148残基にマップされ、さらに詳細な解析により抑制活性は1976番または2011番のアミノ酸残基への2アミノ酸挿入、または、1942番から1950番の欠失によって完全に喪失する事がわかった。このことはシクラーゼのカルボキシ末端の特定部位に、RAS-cAMP系にポジティブに働く何らかの蛋白質が結合しており、熱ショック感受性の抑制は過剰発現されたカルボキシ末端部がその蛋白質を内在性シクラーゼと結合して引き離す事(competitive sequestration)によると考えられた。

5. CAPのシクラーゼ分子上での結合部位の同定

上記実験で競合されているシクラーゼ結合蛋白質がCAPである可能性を考え、上記シクラーゼ変異体とCAPとの結合を抗シクラーゼ抗体を用いた免疫沈降法で測定した。免疫沈降物のなかにCAPが共沈殿して存在しているかを抗CAP抗体を用いたWestern blot法によって解析した。その結果、野生型のシクラーゼではCAPとの結合が観察されたが、シクラーゼのカルボキシ末端部のRAS²^{Val19}表現型の抑制活性を失わせる変異と同じ変異を導入したシクラーゼは、CAPと全く結合していない事が判明した。一方、抗CAP抗体で免疫沈降されるアデニル酸シクラーゼ活性を測定しても、やはりこれらの変異体シクラーゼでは活性が沈降されず、CAPと結合していない事が示された。さらに、2011番アミノ酸残基に変異をもつシクラーゼの高分子量複合体の分子

量は、CAP欠損細胞内で発現した野生型シクラーゼ複合体と同じ67万であった。

6. CAPを結合しないシクラーゼ変異体を用いたCAPの機能の解析

一倍体 (haploid) 酵母細胞の染色体上のシクラーゼ遺伝子を1976番または2011番アミノ酸残基に変異をもつCAP非結合変異体シクラーゼ遺伝子と置換した株を作製し、CAPの結合とRAS^{2^{val19}}表現型との関係を検討した。その結果、CAP非結合変異体シクラーゼの *in vitro* でのRAS蛋白質による活性化の程度は、野生株と同様であったのに対し、これらの変異体シクラーゼ遺伝子を持つ細胞は活性型RAS存在下でも熱ショック感受性を失っていた。その理由を調べるために、それらの細胞での *in vivo* の細胞内cAMP濃度を測定した。RAS^{2^{val19}}を持つ細胞 (TK161-R2V) では、対数増殖時の定常状態cAMP濃度が野生株 (SP1) より7倍高かった。また、グルコース飢餓の後のグルコース投与刺激に反応して、SP1ではcAMPが10 pmol/mg protein から60 pmol/mg protein に上昇したのに対し、TK161-R2Vでは50から230 pmol/mg protein へと上昇した。さらに、刺激後15分で、SP1では刺激前のcAMP濃度に戻ったのに対し、TK161-R2Vでは180 pmol/mg protein と高値が持続し、あまり低下しなかった。ところが、1976番又は2011番の変異体シクラーゼをもつ細胞では、RAS^{2^{val19}}遺伝子存在下でも野生株SP1と同じ定常状態cAMP濃度、およびグルコース刺激に対する反応パターンを示した。一方、野生型RAS遺伝子存在下でのcAMP濃度とグルコース反応パターンは、変化しなかった。

結 論

本研究により、出芽酵母アデニル酸シクラーゼのRAS蛋白質との相互作用に、シクラーゼ中央部のロイシンに富む23アミノ酸の反復配列 (leucine-rich repeat) 領域が必須である事が証明された。また、シクラーゼのカルボキシ末端の148アミノ酸の領域の過剰発現がRAS^{2^{val19}}変異によってひきおこされる熱ショック感受性形質を抑制する事の発見に基づいて、その機構がCAPを内在性シクラーゼと競合して sequestration する事によると予測し、最終的に、その予測が正しく、この領域がCAPとの結合部位である事を生化学的に証明した。さらに、この領域中のアミノ酸番号1950-1959, 1976, 2011等の部位の変異によりアデニル酸シクラーゼはCAP結合能力を失う事もわかった。

また、Mg²⁺存在下RAS蛋白質依存性シクラーゼ活性をもつ複合体が、Mn²⁺依存性RAS蛋白質非依存性シクラーゼ活性をもつ複合体より大きな分子量を有する事がわかり、この結果はMn²⁺依存性複合体に何か別の蛋白質が結合する事によりRAS蛋白質との反応性が獲得される事を示唆した。このようなシクラーゼ結合蛋白質の候補としてCAPが考えられ、実際、CAPはRAS蛋白質依存性活性をもつシクラーゼ高分子量複合体に特異的な構成成分であったが、予想に反してCAPはアデニル酸シクラーゼのRAS蛋白質による活性化には *in vivo* でも *in vitro* でも必須ではない事が証明された。現在のところ、2つの複合体のCAPの存否以外の構造的な違いは不明である。しかし、本研究で得たCAPを結合しないアデニル酸シクラーゼ変異体を用いる事により、CAPがシクラーゼ分子に結合する事は、活性型RAS²存在下での熱ショック感受性形質の獲得に必要である事がわかった。*In vivo* でのグルコース刺激によるcAMP濃度変化の測定により、CAP非結合性変異体シクラーゼをもつ細胞は、RAS^{2^{val19}}存在下でも野生型細胞と同様のパターンをとり、定常状態でのcAMP濃度も野生型に近い事がわかった。この結果は活性型RASによる異常なcAMP産生には、CAPとの結合が必要である事を示していた。一方、野生型RAS^{2^{val19}}存在下では、CAPとの結合はcAMP濃度やグルコース刺激に対する反応に影響がなかった。

従って、この結果および先述の *in vitro* での実験結果より、CAP はアデニル酸シクラーゼの RAS 蛋白質との相互作用には必要ではないが、RAS-cAMP 系内においてシクラーゼの RAS との相互作用以外の何らかの調節機構（例えばシクラーゼのフィードバック調節、細胞内局在の調節、等）にポジティブに関与している事が強く示唆された。さらに、その作用は活性化された RAS 2^{V611G} に特異的であるとの知見が得られた。すなわち、CAP をシクラーゼから引き離すと正常型（野生型）RAS の作用には影響がなく、活性型 RAS の作用のみが抑制された。これは、標的蛋白質（エフェクター）の変異により、活性化 RAS 蛋白質の作用が特異的に（正常 RAS 蛋白質に影響を与えずに）抑制された初めての例である。現在その機構は明らかではないが、同じような方法が高等生物で応用できる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

ras プロト癌遺伝子は、真核生物に広く存在し、細胞の増殖および分化の調節に重要な働きをしていることが知られている。*ras* プロト癌遺伝子産物（RAS 蛋白質）は低分子量 GTP 結合蛋白質ファミリーの一員であり、脊椎動物では細胞増殖因子受容体からのシグナルを核に伝達する中間段階を担っていると考えられている。しかし、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、その RAS 蛋白質がアデニル酸シクラーゼ (*CYR1* 遺伝子産物) を GTP 依存性に調節（活性化）している事が知られている。アデニル酸シクラーゼは 2026 アミノ酸よりなる活性サブユニットと分子量約 7 万のシクラーゼ結合蛋白質 (Cyclase-Associated Protein) CAP の複合体より成る。CAP の機能に関して、CAP は二つの機能をもつ蛋白質であり、カルボキシ末端側は多分アクチンと結合して細胞骨格の維持に関係しており、アミノ末端側は、シクラーゼの RAS 蛋白質との相互作用に必要であることが提唱されていた。

本研究者は、まずアデニル酸シクラーゼに人為的突然変異を導入し、RAS 蛋白質および CAP との相互作用に必要な部位を同定した。RAS 蛋白質との相互作用には、シクラーゼ分子上アミノ酸番号 700-1300 の領域に活性部位と独立して存在するロイシンに富む 23 アミノ酸の単位配列の 26 回の反復構造 (leucine-rich repeat) が、CAP との結合にはシクラーゼのカルボキシ末端 140 アミノ酸残基が必要なことを示した。さらに、上記領域中で、相互作用に必要なアミノ酸残基を詳細に解析した。また、CAP の機能を部位特異的遺伝子破壊法により染色体上 CAP 遺伝子をこわして解析した結果、CAP はシクラーゼの RAS 蛋白質との相互作用には必須ではない事を証明した。さらに、染色体シクラーゼ遺伝子を CAP を結合しないシクラーゼ変異体で置換した細胞株を作製し、それを用いて CAP の RAS-cAMP 系における機能について解析した。その結果、CAP はアデニル酸シクラーゼの RAS 蛋白質との相互作用自体には必要ではないが、RAS-cAMP 系内においてシクラーゼの RAS との相互作用以外の何らかの調節機構（例えばシクラーゼのフィードバック調節、細胞内局在の調節、等）にポジティブに関与している事が強く示唆された。さらに、その作用は突然変異により活性化された RAS 2 (*RAS 2^{V611G}*) に特異的であるとの知見が得られた。すなわち、CAP をシクラーゼから引き離すと正常型（野生型）RAS の作用には影響がなく、活性型 RAS の活性のみが抑制された。これは、標的蛋白質（エフェクター）の変異により、活性化 RAS 蛋白質の作用が特異的に（正常 RAS 蛋白質に影響を与えずに）抑制された初めての例である。現在その機構は明らかでないが、同じような方法が高等生物で応用できる可能性がある。

本研究は、出芽酵母アデニル酸シクラーゼ結合蛋白質 CAP について、その細胞内機能を研究した

ものであるが、従来ほとんど不明であったRAS-cAMP系路におけるCAPの機能とその活性型RAS特異的な作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）学位を得る資格があると認める。